

200/0140

厚生科学研究研究費補助金

がん克服戦略研究事業

がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成14(2002)年 4月

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略事業）
総括研究報告書

がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明

主任研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部長

肺がんで高率(60%)に欠失している第22染色体長腕から、変異(15%)、メチル化(20-40%)が高率に起こっている候補転移抑制遺伝子MYO18Bを単離した。がんの浸潤先進部位で高発現するラミニン-5の $\gamma 2$ 鎖はヒト膀胱がん細胞に強制発現させると強い浸潤性の増殖を示すことを明らかにした。マトリライシンはin vitroで血管内皮細胞の増殖を促進し、in vivoでは血管新生を促進することを見出した。大腸がんではUDP-ガラクトーストランスポートのmRNA、蛋白質が上昇し、この遺伝子の導入によってシアリルLewis a/x抗原の発現が増大し、細胞接着能が亢進することを明らかにした。小胞体ストレス誘導剤によって誘導されるカスパーゼ非依存的細胞死はBcl-2の発現によって抑制され、c-Mycの発現によって亢進されることを見出した。ヒトガングリオシドGM3合成酵素遺伝子をヒト大腸がん細胞株に導入するとGM3合成酵素とその産物ガングリオシドGM3が誘導され、形態変化(分化誘導)が起こってアポトーシスが誘導された。神経毒性を減弱させ、増殖細胞でのみ複製可能とした変異型ヘルペスウィルスは、大腸がん脾注肝転移モデルや同所移植モデルにおいて、移植部位と肝転移の腫瘍増殖を抑制した。ヌードマウス尾静脈への注入によって肺へ高率に転移するヒト骨肉腫細胞株を樹立し、IL-12、adriamycinがこの肺転移を抑制することを明らかにした。

分担研究者

1. 横田 淳 国立がんセンター研究所 部長
2. 齋藤 政樹 明治薬科大学薬効学講座 教授
3. 口野 嘉幸 国立がんセンター研究所 部長
4. 神奈木玲児 愛知県がんセンター研究所 部長
5. 宮崎 香 横浜市立大学木原生物学研究所 教授
6. 久保田哲朗 慶応大学医学部 講師

A. 研究目的

がんは、細胞内に蓄積する遺伝子異常によって発生し、悪性化していくが、その過程で、増殖制御機構の破綻、細胞死からの回避、脱分化、さらには、浸潤能・転移能の獲得など、がん特有な様々な悪性形質を獲得していく。がん細胞内に起こっている遺伝子異常に関する研究はこの20年間で飛躍的に進み、多くのがんで複数のがん遺伝子・がん抑制遺伝子に異常があることが分かってきた。しかし、個々の遺伝子異常によってどのような悪性形質が獲得されるかは未だ不明の点が多く、また、現在までに同定された遺伝子の異常だけでは個々の悪性形質を遺伝子異常との対応では十分に把握できない。

本研究の目的は、がん細胞に特有な悪性形質であ

る、浸潤、転移、細胞死、脱分化の分子機構を解明することにより、臨床で有用ながんの新たな制御法を開発することである。がんの早期診断法などの進歩により多くのがんで根治が可能になってきた現在、がんの悪性化を阻止する治療法の開発、転移腫瘍に対する正確な診断法の開発は、がんの治癒率や生存率のさらなる向上のために極めて重要な研究課題である。本研究では、がん細胞の浸潤・転移・不死化・脱分化の過程を、がん細胞内に起こっている遺伝子異常との関連で把握し、その制御法を検討していく。さらには、独自に開発された胸腔転移や腹膜播種のモデルを用いて、その治療開発研究を進め、適切な臨床試験デザインを作製していく。本研究によって得られる成果により、今後のがん制御へ向けて、実際に生体内での標的分子が整理され、進行がんの治療法を改善する上での多くの情報が得られると期待される。本研究は、世界的にもその重要性は認識されているものの、研究の展開が遅れている分野であり、飛躍的な研究成果が望まれている。以下に本年度の研究方法及その成果を、ここの研究項目ごとに列記する。

B. 研究方法

1. ヒトがんの悪性化に伴って蓄積する遺伝子異常の把握

欠失領域のゲノム配列から GENSCAN プログラムを用いてエクソンを推定し、RT-PCR 法と primer extension 法で全長 cDNA を単離して遺伝子の全構造を決定した。変異の検索は PCR-SSCP 法及び WAVE 法で行ない、その確認は direct sequencing 法で行なった。遺伝子のメチル化、アセチル化についての検討は、肺がん細胞株を 5-Aza-deoxycytidine あるいは trichostatin の存在化で培養した後、RNA を回収し、RT-PCR 法で mRNA の変動について検討した。プロモーター CpG アイランドのメチル化は bisulfite-sequencing 法で調べた。

2. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

ヒト繊維肉腫細胞 HT1080 に LN5 を強制発現させることによって、 γ 2 鎖が切断されない組み換え LN5 変異体をヒト胃がん細胞 MKN-28 を用いて作製することによって、さらに γ 2 鎖を単独で強制発現させたヒト膀胱がん細胞 EJ-1 を作製することによって、LN5 およびその γ 2 鎖のがんの悪性増殖における意義を調べた。マトリライシン処理したヒト大腸がん細胞 (Colo202 および WiDr) を用いて、細胞凝集促進機構、およびそれと転移促進との関係について調べた。大腸菌で得られた組み換え型マトリライシンを使用し、転移能はヌードマウスの脾臓から肝臓への転移を測定して調べた。

3. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析

ゴルジ装置の各種の糖ヌクレオチド・トランスポーター遺伝子およびその est 遺伝子 9 種について、大腸がん組織および周囲非がん組織での mRNA の発現を検索し比較検討した。ヒトがんで有意に変化したものについては、細胞への遺伝子導入によってその機能と生理的意義を解析した。従来から診断が困難である右半大腸がんのスクリーニングに役立つマーカーを目的として、大腸がんにおけるこれらのアイソザイム 11 種の mRNA 発現を検索した。右半大腸がんで特異的に増加する硫酸基転移酵素アイソザイムについては、その酵素産物に特徴的なものがあることを期待して、純品基質を用いた基質特異性の検討を行った。

4. プログラム細胞死に関与する分子の同定とその制御機構の解明

c-Myc を恒常的に発現する Rat-1 細胞株に Ask1 や JNK 遺伝子、さらにはそれらの優性抑制型遺伝子を導入し、アポトーシスシグナルの伝達を検証した。アポトーシスの判定はアクリジンオレンジ染色法、TUNEL 法および顕微鏡による細胞形態観察などの手法を用いて判定した。ヒトグリオーマや神経芽腫由来のヒトがん細胞に tet-off system の制御下で発現の誘導を期待できる野生型 H-ras 遺伝子を導入した細胞を樹立した。これらの細胞に誘導した Ras 依存性細胞死に対する汎カスパーゼ阻害剤や Bcl-2, Bcl-xL 発現の影響を調べた。細胞死の判定はトルイジンブルーを用いた dye-exclusion assay を用いた。

5. 脱分化に関与する遺伝子の同定とその制御機構の解明

複合糖質ガングリオシド GM3 の合成酵素遺伝子を導入・強制発現させて本酵素並びに産物の生物活性を解析した。本酵素欠損マウス作成のため、GM3 合成酵素 (SAT-1) 遺伝子の Exon 2 を含むクローンの制限酵素地図を作製、ターゲッティングベクターを構築し ES 細胞に導入した。電気穿孔法で 230 個のコロニーをクローン化し、4 個 (1.7%) の相対的組み換えクローンを単離した。そのうち 1 つについて 75% キメラマウスが作成でき、ヘテロ型マウスの作出に成功した。ホモマウスの作成並びに別のクローンのキメラマウス作成を試みている。ガングリオシド (GM3 並びに GD3) のマイクロドメイン形成の検索は、免疫化学的染色後の光学顕微鏡下並びに電顕下観察、走査電顕及び共焦点レーザー顕微鏡下観察を行った。

6. 転移モデルの作製とそれを用いた新しい抗転移治療法の開発

5 週齢の雄性 BALB/c マウスと CT26 マウス大腸癌系を用いて、両側皮下移植モデル、脾注肝転移モデル、盲腸同所移植肝転移モデルを作製した。G207 は神経毒性のドメインを 1/200 に減弱させ、Lac G 遺伝子導入部位の replication domain を抑止した変異型ヘルペスウイルスであり、増殖細胞においてのみ複製可能としたウイルスである。皮下移植モデルでは右側腫瘍にのみ、脾注モデルでは脾腫瘍に、同所移植モデルでは同所移植部にのみ、G207 の局注を行った。

6種のヒト骨肉腫由来細胞株 (HuO9、Saos-2、U-2OS、G-292、HOS、MG-63) を用いて、ヌードマウスの皮下注射、尾静脈注射によって腫瘍原性と転移能を判定した。肺転移腫瘍細胞の尾静脈注射を繰り返すことにより高転移株を単離した。RT-PCR法で様々な遺伝子の発現について検討した。5mg/kgのadriamycinと500ng/injectionのIL-12を投与し、治療効果を判定した。

(倫理面への配慮)

手術標本を用いた研究は、病理学的検査の後に残った組織を対象として、検体をコード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行なった。動物実験は動物の生命や苦痛に対して十分な倫理的配慮を払って行なった。

C. 研究成果

1. ヒトがんの悪性化に伴って蓄積する遺伝子異常の把握

我々は以前に、肺がんでは、小細胞がん、非小細胞がんともに、高頻度に第22染色体長腕(22q)の欠失が見られることを報告した。しかし、既知のがん抑制遺伝子には異常が検出されないことから、22q上には肺がんの発生あるいは進展に関与する未知のがん抑制遺伝子が存在すると推定している。昨年、我々は肺小細胞がん細胞株Lu24において、22q11.2~q12.1に大きさ約428kbホモ欠失を見出した。さらに、未知のがん抑制遺伝子の同定を目的に、欠失領域内の遺伝子探索を行い、SEZ6L遺伝子を同定した。しかし、肺がんにおけるSEZ6L遺伝子異常は稀(<5%)であり、標的遺伝子はまだ他にあると考えられた。そこで本年度は、欠失領域のゲノム配列からGENSCANプログラムを用いてエクソンを推定し、RT-PCR法により、新規遺伝子MYO18Bの全長cDNAを単離した。その構造解析から、MYO18Bは2567アミノ酸からなるミオシン重鎖ファミリーに属する蛋白質をコードしており、ゲノム配列との比較により43のエクソンで構成される遺伝子であることが分かった。肺がんの細胞株75例と手術検体46例を対象にMYO18B遺伝子変異の検索を行ったところ、細胞株14例(19%)、手術検体6例(13%)で変異が検出された。MYO18B遺伝子は、正常肺を含む様々なヒト組織で発現していたが、肺がん細胞株

では46例中36例(78%)で発現していなかった。MYO18B遺伝子が発現していない細胞株14例を5-Aza-dCで処理すると9例(64%)で発現が回復した。また、TSAの処理後には14例中11例で発現が回復した。次に、肺がんの細胞株42例と手術検体40例を対象に、MYO18B遺伝子プロモーターCpGアイランドのメチル化をbisulfite-sequencing法で調べると、細胞株8例(19%)、手術検体14例(35%)で過メチル化していた。以上の結果から、MYO18B遺伝子はヒト肺がん細胞の約50%で変異、メチル化、脱アセチル化などによって不活性化していると結論した。

2. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

がんの浸潤・転移におけるラミニン5(LN5)およびそのサブユニット γ 2鎖の役割を調べた。腫瘍増殖におけるLN5の意義を明らかにするために、ヒト繊維肉腫細胞HT1080にLN5を強制発現させ、ヌードマウス皮下に注射すると、対照細胞に比べて著しく高い腫瘍形成が見られた。LN5の γ 2鎖の限定分解によるLN5の生理活性の変化の機構を明らかにするために、切断部位に点突然変異を導入した非切断型組換えLN5を作製した。精製した切断型および非切断型LN5の比較から、非切断型LN5では細胞接着活性が低下し、逆に細胞運動活性が亢進することが明らかになった。がん浸潤先進部位での γ 2鎖の単独発現および γ 2鎖の切断の意義を明らかにするために、 γ 2鎖の全長及びN末端部分をヒト膀胱がん細胞に強制発現させ、ヌードマウスでの腫瘍形成能を調べた。その結果、 γ 2鎖強制細胞を腹腔に注射すると、対照細胞に比べて横隔膜への浸潤増殖が顕著であり、腹水の貯留も亢進することが明らかになった。

活性型マトリライシンが細胞膜に結合すると、そのプロテアーゼ活性の発現により緩い細胞凝集が誘導され、ついでカドヘリンを介した強い細胞凝集へ移行することが分かった。この強い細胞凝集を起こした大腸がん細胞をヌードマウスの脾臓に注射すると高度に肝転移を起こしたが、緩い細胞凝集では未処理細胞と比べて顕著な差は見られなかった。精製マトリライシンが培養血管内皮細胞のDNA合成および細胞増殖を亢進させることを明らかにした。一方、マトリライシンをアガロースゲル内に封入してマウス皮下に注入するとその部位に血管新生が誘導

された。同様な血管新生はマトリライシンを発現するWDr大腸がん細胞の注射によっても誘導され、それはマトリライシンに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与によって抑制された。

3. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析

UDP-ガラクトース・トランスポーターのmRNAが、大腸がん組織で非がん粘膜組織よりも有意に増加していることを見出した。このUDP-ガラクトース・トランスポーターcDNAを大腸がん細胞株に導入して糖鎖発現の変化を解析したところ、セレクチンのリガンドであるシアリルルイスa、シアリルルイスxの発現が強く誘導されることが判明した。さらにUDP-ガラクトース・トランスポーターcDNAを導入した細胞では、血管内皮セレクチンへの細胞接着が有意に亢進することが判明した。また、大腸癌細胞を低酸素下で培養すると、UDP-ガラクトース・トランスポーターmRNAの発現誘導が観察された。

大腸がんにおける硫酸基転移酵素群のアイソザイムのmRNA発現解析から、非がん組織に比してがんでは有意に増大するもの2種とがんでは有意に減少するもの2種を見出した。がんが増加するものうちの1つ(HEC-GlcNAc6ST, 別名CHST3)は、統計的に有意に右半大腸に優位に発現していた。さらに、この酵素には、硫酸基転移酵素の活性を測定する際に通常良く用いられる基質のほかに、ムチン型3型母核の糖鎖中のGlcNAcの6位に硫酸基を転移する能力を持つことが分かった。これら硫酸基転移酵素の遺伝子を細胞に導入し、本酵素を導入した細胞のみと反応する単クローン性抗硫酸化糖鎖抗体をスクリーニングした。その結果見出された抗体は、認識糖鎖の構造の詳細はまだ不明であるが、大腸右半に生じた大腸がんと高率に反応し、左半の大腸がん組織との反応頻度はやや低く、非癌大腸粘膜上皮細胞とはほとんど反応しなかった。

4. プログラム細胞死に関与する分子の同定とその制御機構の解明

紫外線照射や抗癌剤処理によって細胞内のAsk1からJNKに至るストレスキナーゼカスケードが活性化され、活性化されたJNKがc-MycのN末端から62および71番目のセリン残基を特異的にリン酸化し、c-Mycの安定化をもたらす。そのアポトーシス誘導能を高めていることを突き止めた。c-Myc依存

的アポトーシスに対して抑制的に働くがん遺伝子H-rasの発現によってグリオーマ細胞や胃がん細胞にカスパーゼ非依存的にアポトーシスと異なった分子機構で制御されるプログラム細胞死が誘導されることを見出した。

5. 脱分化に関与する遺伝子の同定とその制御機構の解明

マウス・ガングリオシドGM3合成酵素欠損マウスの作成を進め、75%キメラマウスの作成、続いてヘテロ型マウスの作出に成功し、ホモマウスの作成並びに別のクローンについてのキメラマウス作成を試みている。一方、全ガングリオシドを欠損したマウス肺癌3LL細胞株にGM3及びGD3合成酵素遺伝子を導入し、ガングリオシドGM3が集ぞくしたGM3-enriched microdomainが細胞内に形成されて細胞表面へ移動し、さらに細胞外へ粒子状態で放出されるダイナミック現象を、免疫蛍光染色法、共焦点レーザー顕微鏡下並びに電子顕微鏡的に見出した。また、GM3発現細胞ではfilopodia形成とがん遺伝子産物c-srcのraftへの集積が促進されるという現象を観察した。

6. 転移モデルの作製とそれを用いた新しい抗転移治療法の開発

大腸がん皮下移植モデルにおいては注入側腫瘍のみならず、対側の腫瘍の増殖抑制が認められた。この際X-gal染色によるLacGは注入部位においてのみ観察されたが、CD4、CD8細胞の浸潤は注入側のみならず、対側腫瘍にも認められた。脾臓肝転移モデルにおいても、脾臓腫瘍のみならず肝転移の抑制が観察された。同所移植モデルにおいても、移植部位と肝転移のいずれも腫瘍増殖が示された。この際の脾細胞を対象として51Cr release assayを施行したところ、CT26に対する細胞障害性が示されたが、meth Aに対する細胞障害性は認められなかった。

6種の骨肉腫細胞株のうち、HuO9とG-292は皮下の注射部位に腫瘍を形成したが、どちらも自然転移は観察されなかった。また、HuO9とSaos-2は尾静脈注射後に肺転移腫瘍を形成したが、特にHuO9は全例200個以上のコロニーを作成し、高転移細胞株であった。そこで、尾静脈注射を3回繰り返すことによって更に高率に転移するクローンHuO9-M112とHuO9-M132を単離した。これらのクローンは親株より早く肺にコロニーを形成したが、

in vitro での増殖速度や皮下注射後の腫瘍原性には有意差がなかった。また、骨肉腫の特徴である osteocalcin、osteopontin や BMP (bone morphogenetic protein) の発現は保たれていた。そこで、HuO9-M112 クローンを用いて、骨肉腫肺転移の治療に有効な adriamycin と IL-12 の治療効果を判定した。その結果、両者とも細胞の尾静脈注射後のマウスの生存期間を有意に延長し、この細胞が治療実験などに有用であることが示された。

D. 考察

1. ヒトがんの悪性化に伴って蓄積する遺伝子異常の把握

MYO18B 遺伝子は、ヒト肺がんの約 50% において体細胞変異や過メチル化、脱アセチル化が検出されることから、肺がんの発生あるいは悪性化に関与する強力な候補がん抑制遺伝子と考えられた。今後、この遺伝子について、各種組織亜型、進行度の肺腺がんにおけるゲノム異常、発現動態、II 型細胞等の正常肺組織構成細胞での発現動態の解析を進めることにより、また、遺伝子産物の機能解析を進めることにより、肺腺がんの発生・進展における MYO18B 遺伝子異常の意義を明らかにしていく予定である。

2. 転移・浸潤に関わるプロテアーゼと細胞外マトリックス分子の解析

がん細胞による LN5 の発現はその増殖を支え、一方、 $\gamma 2$ 鎖単量体の発現はがん細胞の浸潤的増殖を促進すると考えられた。また、 $\gamma 2$ 鎖が切断された LN5 は非切断型 LN5 に比べて細胞接着活性を低下させ、細胞運動能を増加させることが示唆された。腫瘍近傍の血管内皮細胞はマトリライシンを過剰発現する。今回の研究から、マトリライシンががん細胞表面に結合して細胞凝集能を亢進し、その結果、転移能を増大させること、また本酵素が血管内皮細胞の増殖を促進し、血管新生を誘導することが明らかになった。これらの結果は、マトリライシンがオートクライン的に腫瘍細胞の転移を促進し、またパラクライン的に血管新生を促進することを強く示唆している。

3. 転移・浸潤に関わる接着因子の解析

これまでのところ、どうしてがんでシアリルルイス a, シアリルルイス x が増加するのか、その発現亢進の機序が不明であった。今回の検討は、がん細胞

のゴルジ装置における UDP-ガラクトース・トランスポーターの発現増大がその重要な機序であり、血行性転移を制御する治療の新しいターゲットであることを明らかにした。右半大腸がんに優位に発現する 6-硫酸化糖鎖については、今後、その構造を解明する必要がある。HEC-GlcNAc6ST の右半大腸がんでの増加は著明であり、かなり多量の酵素反応産物があると思われる。大腸がんのスクリーニングでは現在抗ヘモグロビン抗体法による潜血検査が主流であるが、蛋白の変性のため、左半に比べ右半大腸がんの検出率が悪いという欠点を持つ。この酵素産物の検出により、このような欠点を補完できる可能性があり、今後、検討する必要がある。

4. プログラム細胞死に関与する分子の同定とその制御機構の解明

これまで不明であった紫外線照射や抗癌剤処理によって励起される c-Myc 依存性のアポトーシス誘導シグナルのミトコンドリア上流域での伝達経路が明らかになった。この成果は、小胞体依存性アポトーシス誘導の c-Myc による昂進現象を含め、アポトーシスの全体的な分子機構の把握に役立つものである。H-Ras に、アポトーシスとは異なった機構で制御されるカスパーゼ非依存性の細胞死を誘導する能力があることを明らかにしたことは、プログラム細胞死の全体像を把握するためだけではなく、アポトーシス耐性を獲得しているヒトがんに対する新たな治療法を開発するためにも貴重な情報となる。

5. 脱分化に関与する遺伝子の同定とその制御機構の解明

ガングリオシドには、細胞間認識・識別機能や細胞増殖・分化制御機能など、多様な生物機能が報告されてきた。本研究は、ガングリオシドの合成代謝系でキーとなる位置に存在し、動物細胞に遍く存在するガングリオシド GM3 とその合成酵素の分子構造・機能発現相互関係の解明とその制がんへの応用を最終目標とし、分子・細胞・生物学的手法を駆使して研究を推進している。本酵素欠損マウスの作出により、ガングリオシドの生物機能の基本的意義の解明と、ガングリオシド発現の発がんへの関与の解明並びに制がんへの応用開発の進展が期待される。

6. 転移モデルの作製とそれを用いた新しい抗転移治療法の開発

G207 は直接抗腫瘍効果のみならず、宿主免疫能

を介して転移腫瘍増殖抑制を示すことが明らかとなった。現在、グリオーマを対象としたG207の臨床試験が計画中であり、Phase I/II study で安全性が確認されればヒト大腸がんに対する臨床応用も可能と考えられる。ヒト骨肉腫細胞株は世界的にも数が少なく、また、腫瘍原生や転移能も弱いものが多いので、転移機構の研究や治療開発研究が進んでいない。今回の検討で得られた肺高転移株は論文で見ると最も高率に転移するヒト骨肉腫細胞株である。今後、この細胞株を用いて、骨肉腫の肺転移機構、さらにはその制御機構まで研究を進展させ、臨床に有意義な基礎的情報を蓄積させていきたい。

E. 結論

転移非小細胞肺癌及び小細胞肺癌で高率(60%)に欠失している第22染色体長腕から、変異(15%)、メチル化(20~40%)が高率に起こっている候補転移抑制遺伝子MYO18Bを単離した。

正常上皮基底膜または腫瘍基底膜のLN5の γ 2鎖がプロテアーゼによって切断されると、LN5は細胞接着型から細胞運動促進型へと変換し、腫瘍細胞の浸潤に寄与すると考えられた。一方、浸潤先進部位では γ 2鎖が単独で発現し、未知の機構でがんの浸潤を支えていると推測された。

がん細胞が発現するマトリライシンは自らの細胞膜に作用して転移を促進する一方、がん細胞周囲の血管内皮細胞が発現するマトリライシンは内皮細胞の増殖と血管新生を誘導することによってがんの増殖と転移に寄与することが示唆された。

がんにおけるUDP-ガラクトース・トランスポーターmRNAの増加は、がんでのシアリルルイス α 、シアリルルイス \times の発現増大を説明する有力な機序と考えられた。また、大腸がんにおける硫酸基転移酵素のアイソザイムのmRNA発現解析から、右半大腸がんの特異性の高い遺伝子とその産物が見出された。

紫外線照射や抗癌剤処理によって励起されるc-Myc依存性のアポトーシス誘導にAsk1-JNKシグナル伝達経路が重要な役割を果たしていることが明らかになった。ヒト細胞にはアポトーシスとは異なった分子機構で制御される細胞死プログラムが存在し、H-Rasの発現によって活性化されることを明らかにした。

ガングリオシドGM3の生合成系キー酵素をコード

する遺伝子の欠損マウス産出の成否も、近い将来、明らかになるものと予想され、本酵素及び産物ガングリオシドGM3の生物学的意義が解明されると期待される。

変異型ヘルペスウイルスG207は腫瘍細胞においてのみ複製可能なウイルスであり、皮下移植・脾注肝転移、同所移植モデルすべてにおいて、注入局所のみならず宿主免疫系を介した非注入腫瘍に対しても抗腫瘍性を発現し、ヒト大腸がん肝転移に対する有力な手段と考えられた。

ヌードマウス尾静脈への注入によって肺へ高率に転移するヒト骨肉腫細胞株を樹立し、IL-12、adriamycinがこの肺転移を抑制することを明らかにした。この転移モデルを用いて新しい転移抑制技術を開発していきたい。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表 論文発表

- 1) Sunaga, N., Kohno, T., Kolligs, F. T., Fearon, E. R., Saito, R. and Yokota, J. Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (β -catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes, Chromosomes, Cancer*, 30:316-321, 2001.
- 2) Yanaihara, N., Kohno, T., Takakura, S., Takei, K., Otsuka, A., Sunaga, N., Takahashi, M., Yamazaki, M., Tashiro, H., Fukuzumi, Y., Fujimori, Y., Hagiwara, K., Tanaka, T. and Yokota, J. Physical and transcriptional map of a 311-kb segment of chromosome 18q21, a candidate lung tumor suppressor locus. *Genomics*, 72:169-179, 2001.
- 3) Shinozaki, H., Okamoto, A., Shimizu, K., Saito, M., Yokota, J. and Ochiai, K. Absence of p51 alterations in human ovarian cancer. *Int. J. Oncol.*, 18:549-552, 2001.
- 4) Takakura, S., Kohno, T., Manda, R., Okamoto, A., Tanaka, T. and Yokota, J.

- Genetic alterations and expression of the protein phosphatase 1 genes in human cancers. *Int. J. Oncol.*, 18:817-824, 2001.
- 5) Shinmura, K., Yamaguchi, S., Saitoh, T., Kohno, T. and Yokota, J. Somatic mutations and single nucleotide polymorphisms of base excision repair genes involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Cancer Lett.*, 166:65-69, 2001.
 - 6) Nagashima, M., Shiseki, M., Miura, K., Hagiwara, K., Linke, S. P., Pedoux, R., Wang, X. W., Yokota, J., Riabowel, K. and Harris, C. C. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:9671-9676, 2001.
 - 7) Kondo, M., Ji, L., Kamibayashi, C., Tomizawa, Y., Randle, D., Sekido, Y., Yokota, J., Lerman, M., Roth, J. and Minna, J. D. Overexpression of candidate tumor suppressor gene FUS1 isolated from the 3p21.3 homozygous deletion region leads to G1 arrest and growth inhibition of lung cancer cells. *Oncogene*, 20:6258-6262, 2001.
 - 8) Tomizawa, Y., Sekido, Y., Kondo, M., Gao, B., Yokota, J., Roche, J., Drabkin, H., Lerman, M. I., Gazdar, A. F. and Minna, J. D. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis following re-expression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:13954-13959, 2001.
 - 9) Woo, I. S., Kohno, T., Inoue, K., Ishii, S. and Yokota, J. Infrequent mutations of the activating transcription factor-2 gene in human lung cancer, neuroblastoma and breast cancer. *Int. J. Oncol.*, 20:527-531, 2002.
 - 10) Park, Y. B., Park, M. J., Kimura, K., Shimizu, K., Lee, S. H. and Yokota, J. Alterations in the INK4a/ARF locus and their effects on the growth of human osteosarcoma cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 133:105-111, 2002.
 - 11) Niki, T., Kohno, T., Iba, S., Moriya, Y., Takahashi, Y., Saito, M., Maeshima, A., Yamada, T., Matsuno, Y., Fukayama, M., Yokota, J. and Hirohashi, S. Frequent co-localization of cox-2 and laminin-5 γ 2 chain at the invasive front of early-stage lung carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 160:1129-1141, 2002.
 - 12) Shimizu, S., Nagasawa, T., Katoh, O., Komatsu, N., Yokota, J. and Morishita, K. EVII is expressed in megakaryocyte cell lineage and enforced expression of the EVII gene in UT-7/GM cells induces megakaryocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292:609-616, 2002.
 - 13) Kimura, K., Nakano, T., Park, Y.-B., Tani, M., Tsuda, H., Beppu, Y., Moriya, H. and Yokota, J. Establishment of human osteosarcoma cell lines with high metastatic potential to lungs and their utilities for therapeutic studies on metastatic osteosarcoma. *Clin. Exp. Metastasis*, in press.
 - 14) Tomizawa, Y., Kohno, T., Kondo, H., Otsuka, A., Nishioka, M., Niki, T., Yamada, T., Maeshima, A., Yoshimura, K., Saito, R., Minna, J. D. and Yokota, J. Clinicopathological significance of epigenetic inactivation of RASSF1A at 3p21.3 in stage I lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, in press.
 - 15) Tagami, S., Inokuchi, J., Kabayama, K., Yoshimura, H., Kitamura, F., Uemura, S., Ogawa, C., Ishii, A., Saito, M., Ohtsuka, Y., Sakae, S. and Igarashi, Y. Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, 277:3085-3092, 2002.
 - 16) Noguchi, K., Kokubu, A., Kitanaka, C., Ichijo, H. and Kuchino, Y. ASK1-signaling promotes c-Myc protein stability during

- apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281:1313-1320, 2001.
- 17) Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Kitanaka, C., Kuchino, Y. and Tsuda, H. Rat neuronal leucine-rich repeat protein-3: cloning and regulation of the gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287:257-263, 2001.
 - 18) Mochizuki, T., Asai, A., Saito, N., Tanaka, S., Katagiri, H., Asano, T., Nakane, M., Tamura, A., Kuchino, Y., Kitanaka, C. and Kirino, T. Akt protein kinase inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide. *J. Biol. Chem.*, 277:2790-2797, 2002.
 - 19) Kitanaka, C., Kato, K., Ijiri, R., Sakurada, K., Tomiyama, A., Noguchi, K., Nagashima, Y., Nakagawara, A., Momoi, T., Toyoda, Y., Kigasawa, H., Nishi, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Tanaka, Y. and Kuchino, Y. Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J. Natl. Cancer Inst.*, 94:358-368, 2002.
 - 20) Sakurada, K., Kitanaka, C., Kokubu, A., Tomiyama, A., Sunayama, J., Kayama, T. and Kuchino, Y. A cellular mechanism that reversibly inactivates pancaspase inhibitor zAsp-CH2-DCB: a potential pitfall causing discrepancy between *in vitro* and *in vivo* caspase assays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291:1022-1030, 2002.
 - 21) Kumamoto, K., Goto, Y., Sekikawa, K., Takenoshita, S., Ishida, N., Kawakita, M., and Kannagi, R. Increased expression of UDP-galactose transporter mRNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants. *Cancer Res.*, 61:4620-4627, 2001.
 - 22) El-Fasakhany, F.M., Uchimura, K., Kannagi, R., and Muramatsu, T. A novel human Gal-3-O-sulfotransferase: molecular cloning, characterization and its implications in biosynthesis of 3'-sulfo Lewisx. *J. Biol. Chem.*, 276:26988-26994, 2001.
 - 23) Ikeda, N., Eguchi, H., Nishihara, S., Narimatsu, H., Kannagi, R., Irimura, T., Ohta, M., Matsuda, H., Taniguchi, N., and Honke, K. A remodeling system of the 3'-sulfo Lewis a and 3'-sulfo Lewis x epitopes. *J. Biol. Chem.*, 276:38588-38594, 2001.
 - 24) Kontani, K., Taguchi, O., Narita, T., Izawa, M., Hiraiwa, N., Zenita, K., Takeuchi, T., Murai, H., Miura, S., and Kannagi, R. Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes. *Br. J. Cancer*, 84:1258-1264, 2001.
 - 25) Sekine, M., Taya, C., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Takenaka, M., Matsuoka, Y., Imai, E., Izawa, M., Kannagi, R., and Suzuki, A. Regulation of mouse kidney tubular epithelial cell-specific expression of core 2 GlcNAc transferase. *Eur. J. Biochem.*, 268:1129-1135, 2001.
 - 26) Ito, K., Ye, C.L., Hibi, K., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Hidemura, K., Ando, H., Kasai, Y., Akiyama, S., and Nakao, A. Paired tumor marker of soluble E-selectin and its ligand sialyl Lewis A in colorectal cancer. *J. Gastroenterol.*, 36:823-829, 2001.
 - 27) Kannagi, R. Fucosyltransferases V and VI. In: N. Taniguchi, K. Honke and M. Fukuda (eds.), *Handbook of Glycosyltransferases and Their Related Genes*, pp. 232-245, Springer-Verlag, 2001.
 - 28) Kannagi, R. Transcriptional regulation of expression of carbohydrate ligands for cell adhesion molecules in the selectin family. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 491: 267-278, 2001.
 - 29) Sawada, M., Moriya, S., Saito, S., Shineha, R., Satomi, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Kannagi, R., and Miyagi, T. Reduced sialidase expression in highly metastatic

- variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. *Int. J. Cancer*, 97:180-185, 2002.
- 30) Koike, C., Luppi, P., Sharma, S. B., Kannagi, R., Nakashima, I., Starzl, T. E., and Trucco, M. Molecular basis of evolutionary loss of α 1,3-galactosyltransferase gene in higher primates. *J. Biol. Chem.*, 277:10114-10120, 2002.
- 31) Uchimura, K., El-Fasakhany, F. M., Hori, M., Hemmerich, S., Blink, S. E., Kansas, G. S., Kanamori, A., Kumamoto, K., Kannagi, R., and Muramatsu, T. Specificities of N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases in relation to L-selectin ligand synthesis and tumor-associated enzyme expression. *J. Biol. Chem.*, 277:3979-3984, 2002.
- 32) Kannagi, R. Use of liposomes containing carbohydrates for production of monoclonal antibodies. *Method. Mol. Biol.*, in press.
- 33) Kagesato, Y., Mizushima, H., Koshikawa, N., Kitamura, H., Hayashi, H., Ogawa, N., Tsukuda, M. and Miyazaki, K. Sole expression of laminin γ 2 chain in invading tumor cells and its association with stromal fibrosis in lung adenocarcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92:184-192, 2001.
- 34) Adachi, Y., Itoh, F., Yamamoto, H., Arimura, Y., Kikkawa-Okabe, Y., Miyazaki, K., Carbone, D. P. and Imai, K. Expression of angiomodulin (TAF/Mac 25) in invading tumor cells and blood vessels correlates with tumor progression and poor prognosis in human colorectal cancers. *Int. Cancer Res.*, 95:216-222, 2001.
- 35) Jin, M., Udagawa, K., Miyagi, E., Nakazawa, T., Hirahara, F., Yasumitsu, H., Miyazaki, K., Nagashima, Y., Aoki, I., Harada, M. and Miyagi, Y. Expression of serine proteinase inhibitor PP5/TFPI-2/MSPI decreases invasive potential of human choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Gynecol. Oncol.*, 83:325-333, 2001.
- 36) Nishizuka, I., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., Kamiyama, M., Hasegawa, S., Momiyama, N., Miyazaki, K. and Shimada, H. Matrilysin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo. *Cancer Lett.*, 173:175-182, 2001.
- 37) Huo, H., Ichikawa, Y., Kamiyama, M., Ishikawa, T., Hamaguchi, Y., Hasegawa, S., Nagashima, Y., Miyazaki, K. and Shimada, H.: MMP-7 (matrilysin) accelerated growth of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Cancer Lett.*, 177:95-100, 2002.
- 38) Dyce, O. H., Ziober, A. F., Weber, R. S., Miyazaki, K., Khariwala, S. S., Feldman, M. and Ziober, B. L. Integrins in head and neck squamous cell carcinoma invasion. *Laryngoscope*, in press.
- 39) Tsuji, T., Kawada, Y., Kai-Murozono, M., Komatsu, S., Han, S. A., Takeuchi, K., Mizushima, H., Miyazaki, K. and Irimura, T. Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and α 3 β 1 integrin (VLA-3). *Clin. Exp. Metastasis*, in press.
- 40) Mizushima, H., Hirotsaki, T., Miyata, S., Takamura, H., Miyagi, Y. and Miyazaki, K. Expression of laminin-5 enhances tumorigenicity of human fibrosarcoma cells in nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.
- 41) Kubota, T., Furukawa, T., Tanino, H., Suto, A., Otani, Y., Watanabe, M., Ikeda, T., and Kitajima, M. Resistant mechanism of anthracyclines-Pirarubicin might breakthrough the p-glycoprotein-mediated drug-resistance of human breast cancer tissues. *Breast Cancer*, 8:333-338, 2001.
- 42) Abe, S., Kubota, T., Otani, Y., Furukawa, T., Watanabe, M., Kumai, K., Akiyama, T., Akinaga, S. and Kitajima, M. UCN-01 (7-Hydroxystaurosporine) inhibits in vivo growth of human cancer cells through

- selective perturbation of G1 phase checkpoint machinery. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92:537-545, 2001.
- 43) Saikawa, Y., Kubota, T., Otani, Y., Kitajima, M., and Modlin, I. M. Cyclin D1 antisense oligonucleotide inhibits cell growth stimulated by epidermal growth factor and induces apoptosis of gastric cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92:1102-1109, 2001.
- 44) Egawa, T., Kubota, T., Furukawa, T., Otani, Y., Watanabe, M., Furukawa, T., Kumai, K., and Kitajima, M. Docetaxel enhances the cytotoxicity of tetrahydropyranyladriamycin in a sequence-dependent manner. *Anticancer Res.*, 21:2597-2600, 2001.
- 45) Minagawa, A., Otani, Y., Kubota, T., Wada, N., Furukawa, T., Kumai, K., Kameyama, K., Okada, Y., Fujii, M., Yano, M., Sato, T., Ito, A. and Kitajima, M. The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in Scid mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92:1322-1328, 2001.
- 46) Yamauchi, T., Watanabe, M., Kubota, T., Hasegawa, H., Ishii, Y., Endo, T., Kabeshima, Y., Yorozuya, K., Yamamoto, K., Mukai, M. and Kitajima, M. Cyclooxygenase-2 expression as a new marker of patients with colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum*, 45:98-103, 2002.
- 47) Narai, S., Watanabe, M., Hasegawa, H., Nishibori, H., Endo, T., Kubota, T. and Kitajima, M. Significance of transforming growth factor β 1 as a new tumor marker for colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 97:508-511, 2002.
- 48) Koh, J., Kubota, T., Migita, T., Abe, S., Hashimoto, M., Hosoda, Y. and Kitajima, M. UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) inhibits the growth of human cancer xenografts through disruption of signal transduction. *Breast Cancer*, 9:50-54, 2002.

がん細胞の特性を規定する遺伝子の研究

分担研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部部长

研究要旨

肺がんの悪性度を規定している新規の候補がん抑制遺伝子として、進行肺非小細胞がんおよび肺小細胞がんを高頻度に欠失している第22染色体長腕から MYO18B 遺伝子を単離した。この遺伝子は、構造解析の結果から、ミオシンファミリーに属する新規のもので、細胞の骨格蛋白質をコードしていると予想された。MYO18B 遺伝子の変異は肺がんの約15%に認められ、メチル化による発現低下も20~40%の頻度で検出され、肺がん全体の約50%で失活していると予想された。また、ヌードマウス尾静脈への注入によって肺へ高率に転移するヒト骨肉腫細胞株 HuO9 を見出し、*in vivo* の選択法でさらに高頻度に転移するクローンを単離した。この高転移クローンの肺転移は IL-12、adriamycin で有意に抑制され、この転移モデルは骨肉腫の転移機構の解明、新しい転移抑制技術の開発に有用であると考えられた。

A. 研究目的

がんの臨床上最も大きな問題のひとつは、がんが転移・再発を起こすことである。そこで、本研究では、転移・再発を最小限に食止めるがんの新たな制御法の開発を目指して以下の2点に関して研究を進めている。ひとつは、進行がんで検出される頻度の高い肺がんの悪性化過程で染色体欠失によって失活している遺伝子の同定である。肺がんの発生と進展には多くのがん抑制遺伝子が関与していると考えられており、このような遺伝子が同定されれば悪性度の診断や分子標的治療の開発に有用である。もうひとつは、ヒト骨肉腫由来の肺高転移細胞株の樹立である。骨肉腫は肺転移の有無、肺転移腫瘍に対する治療の効果が患者の予後に大きく影響するが、有用な肺転移モデルがないために、新たな診断法や治療法の開発が遅れている。したがって、このようなモデルが作製できれば、今後、極めて有用な研究材料として用いることができる。

B. 研究方法

1) 欠失領域のゲノム配列から GENSCAN プログラムを用いてエクソンを推定し、RT-PCR 法と primer extension 法で全長 cDNA を単離して遺伝子の全構造を決定した。変異の検索は PCR-SSCP 法及び WAVE 法で行ない、その確認は direct sequencing 法で行なった。遺伝子のメチル化、アセチル化についての検討は、肺がん細胞株を 5-Aza-deoxycytidine あるいは trichostatin の存在

化で培養した後、RNA を回収し、RT-PCR 法で mRNA の変動について検討した。プロモーター CpG アイランドのメチル化は bisulfite-sequencing 法で調べた。

2) 6種のヒト骨肉腫由来細胞株 (HuO9, Saos-2, U-2OS, G-292, HOS, MG-63) を用いて、ヌードマウスの皮下注射、尾静脈注射によって腫瘍原性と転移能を判定した。肺転移腫瘍細胞の尾静脈注射を繰り返すことにより高転移株を単離した。RT-PCR法で様々な遺伝子の発現について検討した。5mg/kg の adriamycin と 500ng/injection の IL-12 を投与し、治療効果を判定した。

(倫理面への配慮)

手術標本を用いた研究は、病理学的検査の後に残った組織を対象として、検体をコード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行なった。動物実験は動物の生命や苦痛に対して十分な配慮を払って行なった。

C. 研究結果

1) 我々は以前に、肺がんでは、小細胞がん、非小細胞がんともに、高頻度に第22染色体長腕(22q)の欠失が見られることを報告した。しかし、既知のがん抑制遺伝子には異常が検出されないことから、22q上には肺がんの発生あるいは進展に関与する未知のがん抑制遺伝子が存在すると推定している。昨年、我々は肺小細胞がん細胞株 Lu24 において、22q11.2~q12.1 に大きさ約428kb ホモ欠失を見出

した。さらに、未知のがん抑制遺伝子の同定を目的に、欠失領域内の遺伝子探索を行い、SEZ6L遺伝子を同定した。しかし、肺がんにおけるSEZ6L遺伝子異常は稀(<5%)であり、標的遺伝子はまだ他にあると考えられた。そこで本年度は、欠失領域のゲノム配列から GENSCAN プログラムを用いてエクソンを推定し、RT-PCR法により、新規遺伝子 MYO18B の全長 cDNA を単離した。その構造解析から、MYO18B は 2567 アミノ酸からなるミオシン重鎖ファミリーに属する蛋白質をコードしており、ゲノム配列との比較により 43 のエクソンで構成される遺伝子であることが分かった。肺がんの細胞株 75 例と手術検体 46 例を対象に MYO18B 遺伝子変異の検索を行ったところ、細胞株 14 例(19%)、手術検体 6 例(13%)で変異が検出された。MYO18B 遺伝子は、正常肺を含む様々なヒト組織で発現していたが、肺がん細胞株では 46 例中 36 例(78%)で発現していなかった。MYO18B 遺伝子が発現していない細胞株 14 例を 5-Aza-dC で処理すると 9 例(64%)で発現が回復した。また、TSA の処理後には 14 例中 11 例で発現が回復した。次に、肺がんの細胞株 42 例と手術検体 40 例を対象に、MYO18B 遺伝子プロモーター CpG アイランドのメチル化を bisulfite-sequencing 法で調べると、細胞株 8 例(19%)、手術検体 14 例(35%)で過メチル化していた。以上の結果から、MYO18B 遺伝子はヒト肺がん細胞の約 50%で変異、メチル化、脱アセチル化などによって不活性化していると結論した。

2) 6 種の骨肉腫細胞株のうち、HuO9 と G-292 は皮下の注射部位に腫瘍を形成したが、どちらも自然転移は観察されなかった。また、HuO9 と Saos-2 は尾静脈注射後に肺転移腫瘍を形成したが、特に HuO9 は全例 200 個以上のコロニーを作成し、高転移細胞株であった。そこで、尾静脈注射を 3 回繰り返すことによって更に高率に転移するクローン HuO9-M112 と HuO9-M132 を単離した。これらのクローンは親株より早く肺にコロニーを形成したが、*in vitro*での増殖速度や皮下注射後の腫瘍原性には有意差がなかった。また、骨肉腫の特徴である osteocalcin、osteopontin や BMP (bone morphogenetic protein) の発現は保たれていた。そこで、HuO9-M112 クローンをを用いて、骨肉腫肺転移の治療に有効な adriamycin と IL-12 の治療効果を判定した。その結果、両者とも細胞の尾静脈注射後のマウスの生存期間を有意に延長し、この細胞が治療実験などに有用であることが示された。

D. 考察

1) MYO18B 遺伝子は、ヒト肺がんの約 50%において体細胞変異や過メチル化、脱アセチル化が検出されることから、肺がんの発生あるいは悪性化に関与する強力な候補がん抑制遺伝子と考えられた。今後、この遺伝子について、各種組織亜型、進行度の肺腺がんにおけるゲノム異常、発現動態、II型細胞等の正常肺組織構成細胞での発現動態の解析を進めることにより、また、遺伝子産物の機能解析を進めることにより、肺腺がんの発生・進展における MYO18B 遺伝子異常の意義を明らかにしていく予定である。

2) ヒト骨肉腫細胞株は世界的にも数が少なく、また、腫瘍原生や転移能も弱いものが多いので、転移機構の研究や治療開発研究が進んでいない。今回の検討で得られた肺高転移株は論文で見ると最も高率に転移するヒト骨肉腫細胞株である。特に、従来使われている Saos-2 細胞株よりも早く、高率に転移するので、今後、この細胞株を用いて、骨肉腫の肺転移機構、さらにはその制御機構まで研究を進展させ、臨床に有意義な基礎的情報を蓄積させていきたい。

E. 結論

転移非小細胞肺がん及び小細胞肺がんを高率(60%)に欠失している第 2 染色体長腕から、変異(15%)、メチル化(20~40%)が高率に起こっている候補転移抑制遺伝子 MYO18B を単離した。現在、この遺伝子の機能解析を進めている。ヌードマウス尾静脈への注入によって肺へ高率に転移するヒト骨肉腫細胞株を樹立し、IL-12、adriamycin がこの肺転移を抑制することを明らかにした。この転移モデルを用いて新しい転移抑制技術を開発していきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sunaga, N., Kohno, T., Kolligs, F. T., Fearon, E. R., Saito, R. and Yokota, J. Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (β -catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. *Genes, Chromosomes, Cancer*, 30:316-321, 2001.
- 2) Yanaihara, N., Kohno, T., Takakura, S., Takei, K., Otsuka, A., Sunaga, N., Takahashi,

- M., Yamazaki, M., Tashiro, H., Fukuzumi, Y., Fujimori, Y., Hagiwara, K., Tanaka, T. and Yokota, J. Physical and transcriptional map of a 311-kb segment of chromosome 18q21, a candidate lung tumor suppressor locus. *Genomics*, 72:169-179, 2001.
- 3) Shinozaki, H., Okamoto, A., Shimizu, K., Saito, M., Yokota, J. and Ochiai, K. Absence of p51 alterations in human ovarian cancer. *Int. J. Oncol.*, 18:549-552, 2001.
 - 4) Shinmura, K. and Yokota, J. The OGG1 gene encodes a repair enzyme for oxidatively damaged DNA and is involved in human carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.*, 3:597-609, 2001.
 - 5) Takakura, S., Kohno, T., Manda, R., Okamoto, A., Tanaka, T. and Yokota, J. Genetic alterations and expression of the protein phosphatase 1 genes in human cancers. *Int. J. Oncol.*, 18:817-824, 2001.
 - 6) Shinmura, K., Yamaguchi, S., Saitoh, T., Kohno, T. and Yokota, J. Somatic mutations and single nucleotide polymorphisms of base excision repair genes involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Cancer Lett.*, 166:65-69, 2001.
 - 7) Saitoh, T., Shinmura, K., Yamaguchi, S., Tani, M., Seki, S., Murakami, H., Nojima, Y. and Yokota, J. Enhancement of OGG1 protein APLyase activity by increase of APEX protein. *Mutation Res.*, 486:31-40, 2001.
 - 8) Hanaoka, T., Sugimura, H., Nagura, K., Ihara, M., Li, X.-J., Hamada, G. S., Nishimoto, I., Yokota, J. and Tsugane, S. hOGG1 exon7 polymorphism and gastric cancer in case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Lett.*, 170:53-61, 2001.
 - 9) Sunaga, N., Kohno, T., Shinmura, K., Saitoh, T., Matsuda, T., Saito, R. and Yokota, J. OGG1 protein suppresses G:C to T:A mutation in a shuttle vector containing 8-hydroxy guanine in human cells. *Carcinogenesis*, 22:1355-1362, 2001.
 - 10) Ookawa, K., Tsuchida, S., Kohno, T. and Yokota, J. Alterations in expression of E2F-1 and E2F-responsive genes by RB, p53 and p21Sdi1/WAF1/Cip1 expression. *FEBS Lett.*, 500:25-30, 2001.
 - 11) Nagashima, M., Shiseki, M., Miura, K., Hagiwara, K., Linke, S. P., Pedoux, R., Wang, X. W., Yokota, J., Riabowel, K. and Harris, C. C. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:9671-9676, 2001.
 - 12) Kondo, M., Ji, L., Kamibayashi, C., Tomizawa, Y., Randle, D., Sekido, Y., Yokota, J., Lerman, M., Roth, J. and Minna, J. D. Overexpression of candidate tumor suppressor gene FUS1 isolated from the 3p 21.3 homozygous deletion region leads to G1 arrest and growth inhibition of lung cancer cells. *Oncogene*, 20:6258-6262, 2001.
 - 13) Kimura, K., Shinmura, K., Hasegawa, T., Beppu, Y., Yokoyama, R. and Yokota, J. Germline p53 mutations in a patient with multiple primary cancers. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31:349-351, 2001.
 - 14) Tomizawa, Y., Sekido, Y., Kondo, M., Gao, B., Yokota, J., Roche, J., Drabkin, H., Lerman, M. I., Gazdar, A. F. and Minna, J. D. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis following re-expression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:13954-13959, 2001.
 - 15) Kanamori, M., Schnell, A. H., Inoue, N., Yamamura, Y., Wang, Y., Suzuki, M., Takeuchi, H., Shinmura, K., Yokota, J., Tajima, K., Elston, R. C. and Sugimura, H. Segregation analysis of gastric cancer in a Japanese population. *Int. J. Human Genet.*, 1:263-270, 2001.
 - 16) Woo, I. S., Kohno, T., Inoue, K., Ishii, S. and Yokota, J. Infrequent mutations of the activating transcription factor-2 gene in human lung cancer, neuroblastoma and breast cancer. *Int. J. Oncol.*, 20:527-531, 2002.
 - 17) Park, Y. B., Park, M. J., Kimura, K., Shimizu, K., Lee, S. H. and Yokota, J. Alterations in the INK4a/ARF locus and their effects on

- the growth of human osteosarcoma cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet.*, in press, 2002.
- 18) Niki, T., Kohno, T., Iba, S., Moriya, Y., Takahashi, Y., Saito, M., Maeshima, A., Yamada, T., Matsuno, Y., Fukayama, M., Yokota, J. and Hirohashi, S. Frequent co-localization of cox-2 and laminin-5 g2 chain at the invasive front of early-stage lung carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 160:1129-1141, 2002.
- 19) Yamaguchi, S., Shinmura, K., Saitoh, T., Takenoshita, S., Kuwano, H. and Yokota, J. A single nucleotide polymorphism at the splice donor site of the human MYH base excision repair gene results in reduced translation efficiency of its transcripts. *Genes to Cells*, in press, 2002.
- 20) Shimizu, S., Nagasawa, T., Katoh, O., Komatsu, N., Yokota, J. and Morishita, K. EVI1 is expressed in megakaryocyte cell lineage and enforced expression of the EVI1 gene in UT-7/GM cells induces megakaryocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2002.
- 21) Kimura, K., Nakano, T., Park, Y.-B., Tani, M., Tsuda, H., Beppu, Y., Moriya, H. and Yokota, J. Establishment of human osteosarcoma cell lines with high metastatic potential to lungs and their utilities for therapeutic studies on metastatic osteosarcoma. *Clin. Exp. Metastasis*, in press, 2002.
- 22) Yanagitani, N., Kohno, T., Sunaga, N., Kunitoh, H., Tamura, T., Tsuchiya, S., Saito, R. and Yokota, J. Localization of a human lung adenocarcinoma susceptibility locus, possibly syntenic to the mouse Pas1 locus, in the vicinity of the D12S1034 locus on chromosome 12p11.2-p12.1. *Carcinogenesis*, in press, 2002.
- 23) Tomizawa, Y., Kohno, T., Kondo, H., Otsuka, A., Nishioka, M., Niki, T., Yamada, T., Maeshima, A., Yoshimura, K., Saito, R., Minna, J. D. and Yokota, J. Clinicopathological significance of epigenetic inactivation of RASSF1A at 3p21.3 in stage I lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.*, in press, 2002.

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

細胞脱分化の制御機構に関する研究

分担研究者 齋藤 政樹 明治薬科大学教授

研究要旨：細胞増殖制御作用を持ち生体内に広く存在するガングリオシドの生理的意義を明らかにする目的で、マウス・ガングリオシド GM3 合成酵素欠損マウスの作成を進めた。一方、全ガングリオシドを欠損したマウス肺癌 3LL 細胞株に GM3 及び GD3 合成酵素遺伝子を導入し安定変異株を樹立して解析した結果、ガングリオシド GM3 が集ぞくしたマイクロドメインが細胞内に形成されて細胞表面へ移動し、さらに細胞外へ粒子状態で放出されるダイナミック現象を、免疫蛍光染色法、共焦点レーザー顕微鏡下並びに電子顕微鏡的に初めて見出した。また、GM3 発現細胞では偽足形成と癌遺伝子産物 c-src のラフトraftへの集積が促進されるという現象を観察した。

A. 研究目的

生体膜複合糖質・脂質分子（とくに糖脂質及びスフィンゴ脂質）はそれ自体で生体超分子を形成し、さらに細胞内の癌遺伝子産物やシグナル伝達蛋白分子と機能複合体マイクロドメインを形成して細胞間相互認識・情報伝達に関わっている。この側面から悪性化のしくみを明らかにし、その制御を介して制がんを目指す。

B. 研究方法

癌細胞の増殖抑制並びに分化誘導現象（脱分化からの脱却）に深く関与する複合糖質ガングリオシド GM3 の合成酵素について昨年度に引き続き、本酵素遺伝子を導入・強制発現させて本酵素並びに産物の生物活性を解析した。本酵素欠損マウス作成のため、GM3 合成酵素（SAT-I）遺伝子の Exon 2 を含むクローンの制限酵素地図を作製、ターゲティングベクターを構築し ES 細胞に導入した。電気穿孔法で 230 個のコロニーをクローン化し、4 個（1.7%）の相対的組み換えクローンを単離した。そのうち 1 つについて 75%キメラマウスが作成でき、ヘテロ型マウスの作出に成功した。ホモマウスの作成並びに別のクローンのキメラマウス作成を試みている。in vivo における糖鎖リモデリングによる病態生理の解析と共に発癌性変化などを追究して、糖鎖機能を統合的に探る予定である。ガングリオシド（GM3 並びに GD3）のマイクロドメイン形成の検索は、免疫化学的染色後の光学顕微鏡下並びに電顕下観察、走査電顕及び共焦点レーザー顕微鏡下観察を行った。

C. 研究結果

昨年度に引き続き、細胞増殖制御作用を持ち生体内に広く存在するガングリオシドの生理的意義を明らかにする目的で、マウス・ガングリオシド GM3 合成酵素欠損マウスの作成を進めた。75%キメラマウスの作成、

続いてヘテロ型マウスの作出に最近成功し、ホモマウスの作成並びに別のクローンについてのキメラマウス作成を試みている。一方、全ガングリオシドを欠損したマウス肺癌 3LL 細胞株に GM3 及び GD3 合成酵素遺伝子を導入し安定変異株を樹立して解析した結果、ガングリオシド GM3 が集ぞく(enriched)した直径 50-100nm の GM3-enriched microdomain が細胞内に形成されて細胞表面へ移動し、さらに細胞外へ粒子 particles 状態で放出されるダイナミック現象を、免疫蛍光染色法、共焦点レーザー顕微鏡下並びに電子顕微鏡的に初めて見出した。また、GM3 発現細胞では filopodia 形成と癌遺伝子産物 c-src の raft への集積が促進されるという現象を観察した。

D. 考察

生体膜構成因子であり、複合糖質分子ファミリーを形成しているガングリオシドには、多様な生物機能が報告されてきた。その代表的なものが、細胞間認識・識別機能であり、細胞増殖・分化制御機能である。本研究は、ガングリオシドの合成代謝系でキーとなる位置に存在し、動物細胞に広く存在するガングリオシド GM3 とその合成酵素の分子構造・機能発現相互関係の解明とその制癌への応用を最終目標とし、分子・細胞・生物学的手法を駆使して研究推進している。本酵素欠損マウスの作出の成否は、ガングリオシドの生物機能の基本的意義の解明と、また作出に成功した際に予想される、ガングリオシド発現の発癌性への関与の解明並びに制癌への応用開発の進展を期待している。

E. 結論

細胞増殖制御作用を持ち ubiquitous に存在するガングリオシドの生合成系キー酵素をコードする本糖鎖遺伝子の発現制御機構が徐々に明らかになりつつある。また、本遺伝子欠損マウスの産出の成否も近い将来明確になるものと予想され、本酵素及び産物ガングリオ

シド GM3 の生物学的意義の解明もそれほど遠くない将来に達成されるものと予想される。ガングリオシド GM3 は細胞の種類によって、発現機能が異なるので、本酵素及び産物の制癌応用に関しては、個々の癌細胞で詳細に検討する必要があると思われる。これは、同一機能性分子の機能発現過程、即ちシグナル伝達機構、において明確な相違、いわば「枝分かれ現象」があるものと予想された。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tagami,S., Inokuchi,J., Kabayama,K., Yoshimura,H., Kitamura,F., Uemura,S., Ogawa,C., Ishii,A., Saito, M., Ohtsuka,Y., Sakaue,S. and Igarashi,Y.: Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, 277: 3085-3092, 2002 (accepted, November 13, 2001).

2) Matsumoto,S., Kamei,D., Ishii,A., Sakai,R., Nishimura,S. and Saito,M.: Expression and characterization of the active form of human ganglioside GM3 synthase in *Escherichia coli* as MBP-fusion protein. *Biochem. J.*, in press.

3) Mogi,H., Ishii,A., Inokuchi,J., Saito,M., and Nojiri,H.: Introduction of ganglioside GM3 synthetic sialyltransferase-1 gene induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, in press.

2. 学会発表

1) Promoter region analysis of human GM3 synthase gene: Ishii A, Kamei D, Nakamura C, Ishiyama T, and Saito M. Fifth Joint Conference of AACR (米国癌学会) and JCA (日本癌学会), 2001/2, Maui, Hawaii, USA

2) Ultrastructure of GM3-enriched extracellular particles budding from GM3-enriched rafts: Matsuda K, Ichinose S, Sato Y, Inokuchi J, Ishii A and Saito M. Fifth Joint Conference of AACR (米国癌学会) and JCA (日本癌学会), 2001/2, Maui, Hawaii, USA

3) Identification of domains of Cas essential for actin cytoskeleton reorganization cell migration Src activation and transformation: Huang J H, Miyake I, Saito M., and Sakai R, Fifth Joint Conference of AACR (米国癌学会) and JCA (日本癌学会), 2001/2, Maui, Hawaii, USA

4) Expression and characterization of the active form of human gangli- oside GM3 synthase (sialyl-transferase-1/ST3GalV) in *Escherichia coli* : S

Matsumoto, D Kamei, A Ishii, K Matsuda, R Sakai, S Nishimura and M Saito, XVth International Symposium on Glycoconjugates, 2001/8, The Hague, Netherlands.

5) Dynamism of ganglioside GM3-enriched particles shed from GM3-enriched membrane microdomains: Matsuda K, Ichinose S, Sato Y, Inokuchi J, Ishii A and Saito M, XVth International Symposium on Glycoconjugates, 2001/8, The Hague, Netherlands

6) EXPRESSION OF HUMAN GANGLIOSIDE GM3 SYNTHASE IN *ESCHERICHIA COLI* AND DYNAMISM OF GANGLIOSIDE GM3 IN MAMMALIAN CELLS~Localization of the active enzyme in *E.coli* and microdomain formation of the product GM3 in murine 3LL cells~: Masaki Saito, Ishii,A., Matsumoto,S., and Matsuda,K. ISN(国際神経化学会)/ASN(米国神経化学会) sponsored Satellite Meeting "Directions in Sphingolipid Research for the New Millenium", 2001/8, Iguazu, Argentina (an invited lecture)

7) MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GANGLIOSIDE GM3 SYNTHETIC SIALYL-TRANSFERASE -1 AND ITS APOPTOSIS-INDUCING ACTIVITY AGAINST HUMAN COLON CANCER HCT116 CELLS: Saito M., Mogi H., Matsumoto S., Kamei D., Ishii A. and Nojiri H, Joint International Congress on APL and Differentiation Therapy, 2001/10, Rome, Italy (an invited lecture)

8) MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BIOFUNCTIONAL GM3 GANGLIOSIDE SYNTHETIC SIALYLTRANSFERASE-1 : ITS EXPRESSION CHARACTERISTICS AND GENOMIC STRUCTURE : Saito,M., Kamei,D.*, Nakamura,C.*, Matsuda,K.*and Ishii,A.*, 30th Annual Meeting of International Society of Experimental Hematology (ISEH) (第30回国際実験血液学会), 2001/8, Tokyo

9) Cloning of membranous and secreted proteins from stromal cells by the signal sequence trap method: H.Ueno, T.Kitamura, T.Nakano, M.Saito, 30th Annual Meeting of International Society of Experimental Hematology (ISEH) (第30回国際実験血液学会), 2001/8, Tokyo

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきこと無し。

厚生省がん克服戦略研究事業
分担研究報告書

分野 1 がん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握およびその制御機構の解明
(主任研究者 横田 淳)

分担研究課題 プログラム細胞死の制御機構に関する研究

分担研究者 口野 嘉幸 国立がんセンター研究所生物物理部長

研究要旨： これまでにアポトーシス制御に関わるがん遺伝子・がん抑制遺伝子産物の役割を検討するとともに、がんが獲得しているアポトーシス耐性の実態解明に挑んできた。その結果としてミトコンドリア上流域でのc-Myc依存性アポトーシスのシグナル伝達系を明らかにするとともに、第三のアポトーシスシグナル伝達系とされる小胞体を介するアポトーシス制御機構の解析を行い、c-Mycがこのシグナル伝達系を活性化することを突き止めた。またこれらとは別にヒト細胞にアポトーシスとは制御機構を異にする細胞死プログラムが存在することを見いだした。この新しいタイプの細胞死プログラムはアポトーシス実行因子であるカスパーゼの活性化を要求せず、変異型p53を発現するがん細胞にも効率よく細胞死を誘導できる特性をもっている。これらの発見は、細胞のがん化におけるプログラム細胞死の役割や、がんの悪性形質獲得の分子機構を知る上で非常に重要で意義深い。

A. 研究目的

アポトーシスを含むプログラム細胞死は、生体(細胞)の恒常性維持に重要な役割を果たしており、その制御異常はがんを含めた様々な疾患の発生原因となっている。多くのがんはその進展の過程においてプログラム細胞死に対する耐性能を獲得し、悪性度を高め、浸潤・転移を凶っていると考えられている。このようなことからプログラム細胞死の実態を解明することはがんの発生や浸潤転移の仕組みを知る上で非常に重要であるといえる。そこで本研究ではわれわれが独自に開発した実験系を用いてアポトーシスを中心に、プログラム細胞死全体の分子制御機構を明らかにし、そこからえられる情報をもとに細胞のがん化におけるプログラム細胞死の役割を明らかにするとともに、プログラム細胞死を標的とした新たながんの治療法を開発していくことを主な目的とした。

B. 研究方法

1. c-Myc発現細胞株へのストレスキナーゼ遺伝子の導入：c-Mycを恒常的に発現するRat-1細胞株にAsk1やJNK遺伝子、さらにはそれらの優性抑制

型遺伝子を導入し、アポトーシスシグナルの伝達効率を検証した。アポトーシスの判定はアクリジンオレンジ染色法、TUNEL法および顕微鏡による細胞形態観察などの手法を用いて判定した。

2. 小胞体ストレス依存性アポトーシス誘導細胞株の樹立：Rat 1, COS, SK-N-SHなどの細胞を小胞体ストレス誘導剤であるブレフェルジンAやサプシガルギンで処理し、細胞死に陥る細胞株を選び出した。

3. 小胞体ストレス依存性アポトーシス誘導におけるc-Mycの影響：小胞体ストレス依存的にアポトーシスを誘導できる細胞株にpCEP4ベクターに組み込んだ野生型c-myc遺伝子を導入し、発現させて、小胞体ストレス依存性のアポトーシス誘導に対するc-Mycの影響を調べた。また同じ細胞に種々の変異型c-myc遺伝子を導入発現させc-Mycのもつどの生物学的機能の発現が小胞体ストレス依存性アポトーシス誘導に要求されるのかを調べた

4. Rasによるカスパーゼ非依存的細胞死誘導系の確立：U251, COS, SK-N-SHなどの細胞にtet-off systemの制御下で発現の誘導を期待できる野生型H-ras遺伝子を導入した細胞を樹立した。これらの細胞に誘導したRas依存性細胞死に対する

汎カスパーゼ阻害剤やBcl-2, Bcl-xLの影響を調べた。細胞死の判定はトルイジンブルーを用いた dye-exclusion assayを行って実施した。

C. 研究結果

1. アポトーシス制御機構：紫外線照射や抗癌剤処理によって細胞内のAsk1からJNKに至るストレスキナーゼカスケードが活性化され、活性化されたJNKによってc-MycのN末端から62および71番目のセリン残基が特異的にリン酸化されることを見いだした。またこれらのセリン残基のリン酸化によって、c-Mycの安定化が図られ、その結果としてc-Mycのもつアポトーシス誘導能が高められるということを明らかにした。
2. プレフェルジンAやサブシガルギン処理による小胞体ストレスの誘導によりカスパーゼ依存的及び非依存的なアポトーシスが誘導され、c-Mycがこの細胞死誘導を昂進することを見いだした。
3. 非アポトーシス性プログラム細胞死：c-Myc依存性アポトーシスに対して抑制的に働くがん遺伝子H-rasの発現によってグリオーマや胃癌由来のヒトがん細胞にカスパーゼ非依存的にアポトーシスとは異なった分子機構で制御される細胞死が誘導されることを見出した。この細胞死ではTUNEL assayが陰性で、核やミトコンドリアでの顕著な形態変化は認められず、代わりに細胞質においてリソソーム由来の空胞の形成が顕著に認められた。またこの細胞死はz-VAD-fmkやz-Asp-CH₂-DCBなどのカスパーゼ阻害剤や、アポトーシス抑制因子Bcl-2の高発現によっても阻害されなかった。

D. 考察

今回の研究でこれまで不明であった紫外線照射や抗癌剤処理によって励起されるc-Myc依存性のアポトーシス誘導シグナルのミトコンドリア上流域での伝達経路が明らかになった。この研究成果は小胞体依存性アポトーシス誘導のc-Mycによる昂進現象を含め、アポトーシスの全体的な分子機構の把握に役立つものと期待される。これとは別にH-Rasにアポトーシスとは異なったメカニズムで制御されるカスパーゼ非依存的な細胞死を誘導する能力のあることがわかったことは、プログラム細胞死の全体像を把握するためだけでなく、アポトーシス耐性を獲得している多くのヒトがんに対する新たな治療法の開発を行っていくための情報を提供してくれるものと期待される。

E. 結論

1. 紫外線照射や抗癌剤処理によって励起されるc-Myc依存性のアポトーシス誘導にAsk1-JNKシグナル伝達経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。
2. ヒト細胞にアポトーシスとは異なった分子機構で制御される細胞死プログラムが存在し、H-Rasの発現によって活性化されることを突き止めた。この発見はがんの発生やがん細胞における悪性形質獲得の分子機構の把握に大きく貢献でき、アポトーシス耐性を獲得しているがんに対する新たな治療法の開発を行えるものとするものと確信している。

F. 健康危険情報

本研究における実験は既存の培養細胞を用いて行っているため倫理面への配慮は特に必要ないと思う。

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Noguchi K, Kokubu A, Kitanaka C, Ichijo H and Kuchino Y. ASK1-signaling promotes c-Myc protein stability during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281: 1313-1320 (2001).
 2. Fukamachi K, Matsuoka Y, Kitanaka C, Kuchino Y and Tsuda H. Rat neuronal leucine-rich repeat protein-3: cloning and regulation of the gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287: 257-263 (2001).
 3. Liang A, Bruenen-Nieweler C, Muramatsu T, Kuchino Y, Beier H and Heckmann K. The ciliate *Euplotes octocarinatus* expresses two polypeptide release factors of the type eRF1. *Gene*, 262: 161-168 (2001).
 4. Muramatsu T, Heckmann K, Kitanaka C and Kuchino Y. Molecular mechanism underlying stop codon recognition by eRF1: a wobble hypothesis for peptide anticodons. *FEBS Letters*, 448: 105-109 (2001).
 5. Mochizuki T, Asai A, Saito N, Tanaka S, Katagiri H, Asano T, Nakane M, Tamura A, Kuchino Y, Kitanaka C and Kirino T. Akt protein kinase inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide. *J. Biol. Chem.*, 277: 2790-2797 (2002).
 6. Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, Sakurada K, Tomiyama A, Noguchi K, Nagashima Y, Nakagawara A, Momoi T, Toyoda Y, Kigasawa H, Nishi T, Shirouzu M, Yokoyama S, Tanaka Y and Kuchino Y. Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J. Natl. Cancer Inst.*, 94: 358-368 (2002).

5. Sakurada K, Kitanaka C, Kokubu A, Tomiyama A, Sunayama J, Kayama T and Kuchino Y. A cellular mechanism that reversibly inactivates pancaspase inhibitor zAsp-CH2-DCB: a potential pitfall causing discrepancy between *in vitro* and *in vivo* caspase assays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291: 1022-1030 (2002).

学会発表

1. 富山新太, 北中千史, 野嘉幸. 小胞体依存性アポトーシスの制御機構: カスパーゼ非依存性細胞死, 平成13年度「脳を知る」「脳を守る」合同シンポジウム“脳の機能とその異常”(京都) 2001年4月
2. 村松知成, Klaus Heckmann, 野嘉幸. 真核生物eRF1による終止コドン認識機構, 第1回日本蛋白質科学会年会(大阪) 2001年6月
3. 野嘉幸. カスパーゼ非依存性プログラム細胞死, 第60回日本癌学会総会(横浜) 2001年9月
4. 北中千史, 野嘉幸. Ras発現により誘導される神経芽腫細胞の非アポトーシス性プログラム細胞死に関わる制御機構, 第60回日本癌学会総会(横浜) 2001年9月
5. 櫻田香, 北中千史, 嘉山孝正, 野嘉幸. アポトーシス細胞に誘導されるカスパーゼ阻害剤不活化因子の解析, 第60回日本癌学会総会(横浜) 2001年9月
6. 富山新太, 北中千史, 鮫島寛次, 野嘉幸. 小胞体ストレス依存性細胞死の制御機構: caspase非依存性細胞死の関与, 第60回日本癌学会総会(横浜) 2001年9月
7. 望月俊宏, 北中千史, 野嘉幸, 浅井昭雄. Aktはセラミドにより誘導されるnon-apoptotic programmed cell deathを抑制する, 第60回日本癌学会総会(横浜) 2001年9月
8. 砂山潤, 北中千史, 野嘉幸. アポトーシス促進性Bcl-2ファミリー蛋白質Hrkに結合する細胞内因子の単離とその機能解析, 第60回日本癌学会総会(横浜) 2001年9月
9. 村松知成, 青柳一彦, 季嘉姫, 佐々木博己, 野嘉幸. ヒトGALGT2のcDNAおよび遺伝子の構造, 第74回日本生化学会大会(京都) 2001年10月
10. 渡部暁, 村松知成, 野嘉幸. ATP依存性プロテアーゼLonの活性制御: SH基修飾剤による活性阻害, 第74回日本生化学会大会(京都) 2001年10月
11. 北中千史, 野嘉幸. Rasにより制御され

る非アポトーシス性プログラム細胞死, 平成13年度生理学研究所研究会「細胞死の分子機構と病態生理」2001年8月

12. 北中千史, 野嘉幸. プログラム細胞死の多様性: 癌の形成・退縮における“Non-apoptotic”プログラム細胞死の役割, 第2回分子脳神経外科学会(名古屋) 2001年9月
13. 村松知成, 季嘉姫, 青柳一彦, 佐々木博己, 北中千史, 野嘉幸. ヒトGALGT2遺伝子とその発現制御, 第24回日本分子生物学会大会(横浜) 2001年12月
14. 北中千史, 野嘉幸. Rasにより誘導される神経芽腫細胞の非アポトーシス性プログラム細胞死に関わる制御機構, 第24回日本分子生物学会大会(横浜) 2001年12月
15. 櫻田香, 北中千史, 嘉山孝正, 野嘉幸. アポトーシス細胞に誘導されるカスパーゼ阻害剤不活化因子の解析, 第24回日本分子生物学会大会(横浜) 2001年12月
16. 富山新太, 北中千史, 国分明子, 鮫島寛次, 野嘉幸. Mechanism of ER stress-mediated caspase-dependent / independent programmed cell death, 第24回日本分子生物学会大会(横浜) 2001年12月
17. 国分明子, 北中千史, 富山新太, 野嘉幸. ERストレスとc-Mycの細胞死誘導における協調作用, 第24回日本分子生物学会大会(横浜) 2001年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし